LES REACTIONS ANTIGENE - ANTICORPS

[redacted]

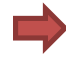
I- INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

L'exploration de l'immunité spécifique nécessite l'utilisation de techniques in vitro mettant en jeu :

- **Des réactions Antigène -Anticorps en vue de l'exploration de l'immunité humorale,**
- **Des techniques d'immunologie cellulaire en vue de l'exploration de l'immunité cellulaire.**

I. INTRODUCTION



Les réactions Antigène- Anticorps sont des techniques utilisables **IN VITRO** en vue de l'identification et/ou le dosage :

- D'un antigène lorsque l'on dispose de l'anticorps spécifique correspondant.
- d'un anticorps lorsque l'on dispose de l'antigène spécifique correspondant.

On dispose actuellement de nombreuses techniques qui se caractérisent de plus en plus par :

- Leur sensibilité
- Leur rapidité d'exécution
- Leur reproductibilité d'où → **fiabilité des résultats**.

I. INTRODUCTION

 **Les principales techniques Ag-Ac :**

	Antigènes solubles	Antigènes particulaires ou solubles fixés sur un support
Anticorps natifs	Techniques de : ♦ Précipitation ♦ Turbidimétrie ♦ Néphélémétrie	Techniques d' : ♦ Agglutination directe ♦ Agglutination passive
Anticorps marqués	Techniques d'Immunodosages utilisant comme traceur : ♦ Un radio-élément → Radio-immunologie ♦ Une enzyme → Immuno-enzymologie ♦ Un luminophore	Techniques : ♦ d'Immunofluorescence ♦ de Cyto-radio-immunologie ♦ de Cyto-enzymo-immunologie

I. INTRODUCTION

 **Les anticorps utilisables :**

1- Des anticorps polyclonaux qui sont poly-spécifiques → :

- **Immunsérums obtenus par mélange de sérums d'un grand nombre d'animaux hyperimmunisés.**
- **Utilisés sous forme de fraction γ globulinique.**

2- Des anticorps monoclonaux qui sont mono-spécifiques.

II- LES REACTIONS DE PRECIPITATION

II. - GENERALITES



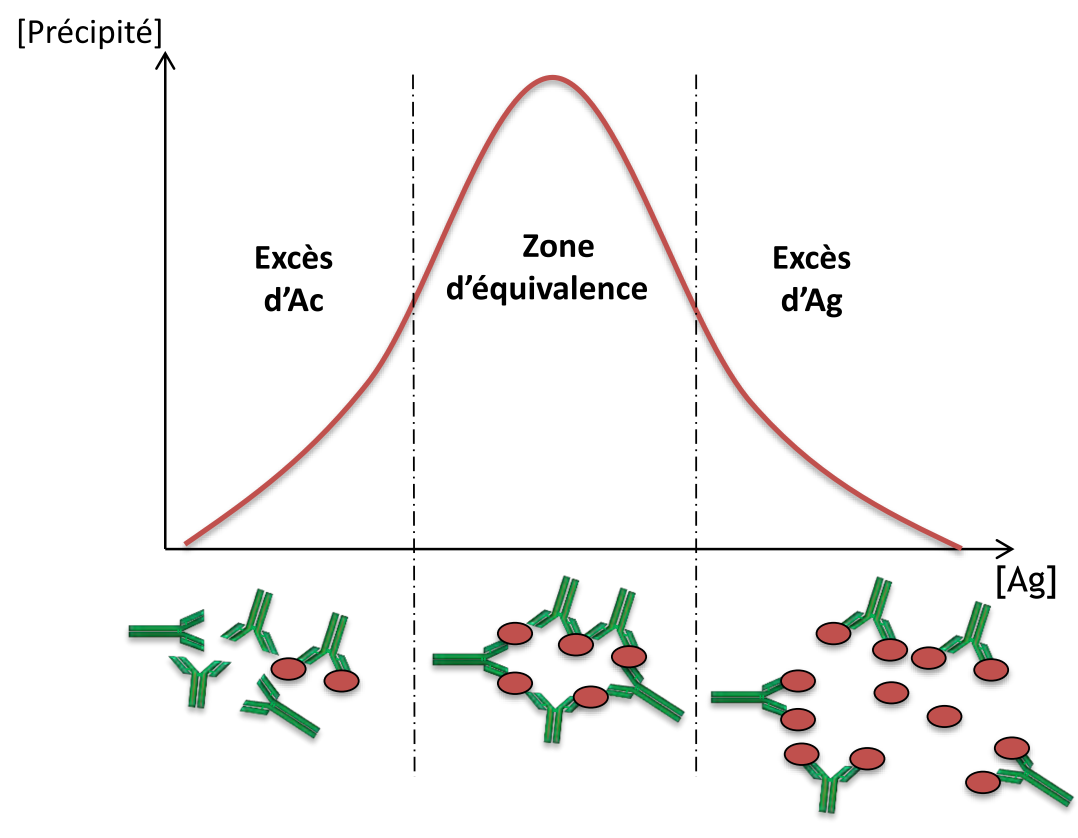
Courbe de Heidelberger et Kendall → :



Quantité croissante d'Ag

Quantité constante d'Ac

- Zone d'excès d'Ac
- Zone d'équivalence
- Zone d'excès d'Ag



II. - GENERALITES

Les réactions de précipitation peuvent se faire :

- **Soit en milieu liquide**
- **Soit en milieu gélifié.**

Les réactions de précipitation peuvent être :

- **Soit qualitatives**
- **Soit quantitatives.**

Les différentes techniques utilisées :

	Techniques qualitatives	Techniques quantitatives
En milieu liquide	• Test de l'anneau (Ring test)	• Néphélométrie et turbidimétrie laser
En milieu solide	• Immunodiffusion double en gel (Ouchterlony) • Electrosynérèse • Immunoélectrophorèse • Immunofixation	• Immunodiffusion radiale (Mancini) • Electroimmunoquantification (Laurell)

II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

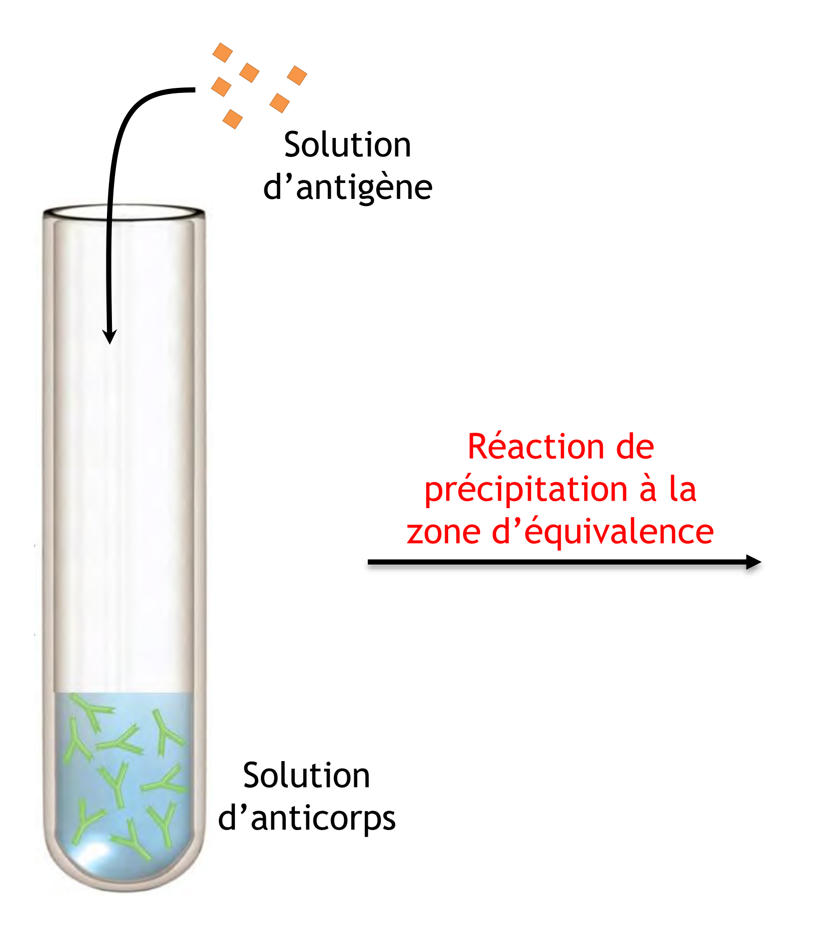


Les Techniques d'immunoprécipitation qualitatives :

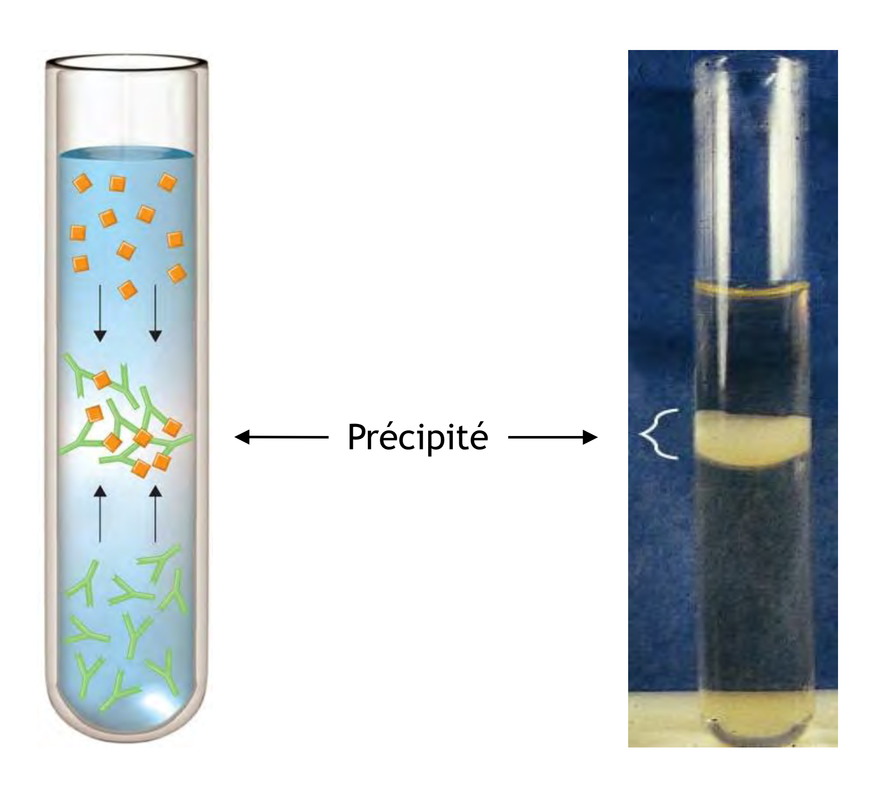
- Test de l'anneau (en milieu liquide)
- Immunodiffusion double en gel (Ouchterlony) (en milieu gélifié)
- Electrosynérèse (en milieu gélifié)
- Immunoélectrophorèse (en milieu gélifié)
- Immunofixation (en milieu gélifié)

II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

a) Technique de l'anneau (Ring test)

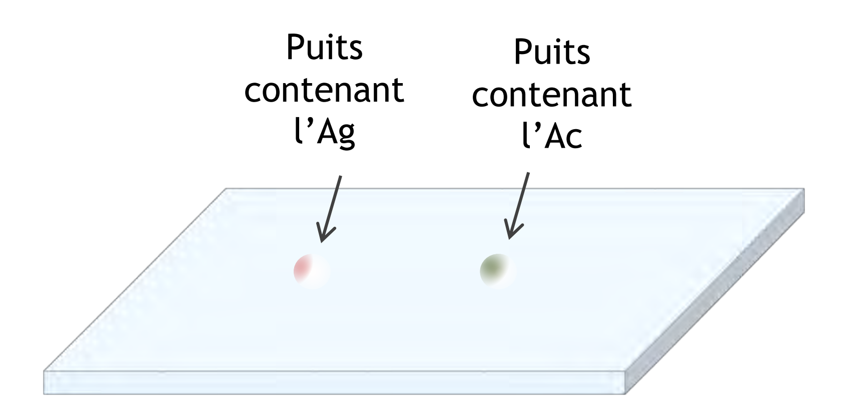


Réaction de précipitation à la zone d'équivalence

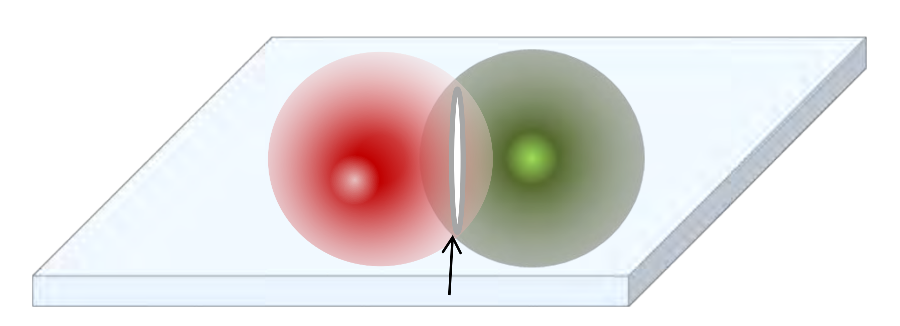


II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

b) Technique d'immunodiffusion double en gel (Test d'Ouchterlony)



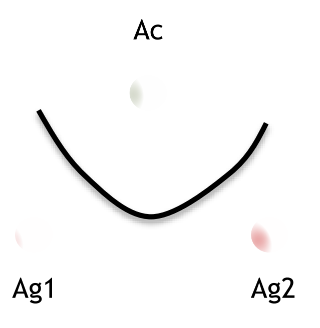
Diffusion et formation de la ligne de précipitation

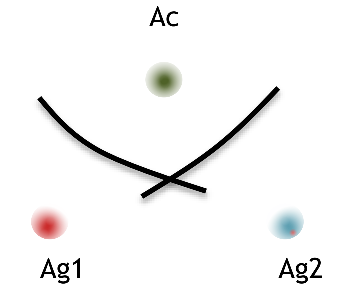


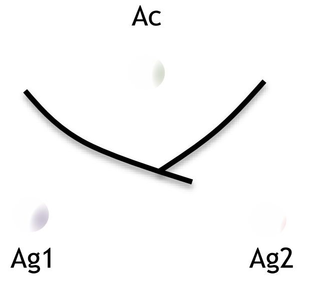
Ligne ou arc de précipitation dans la zone d'équivalence

II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

b) Technique d'immunodiffusion double en gel (Test d'Ouchterlony)







(1) Identité totale

Ag1 et Ag2 présentent une identité immunochimique totale

(2) Absence d'identité

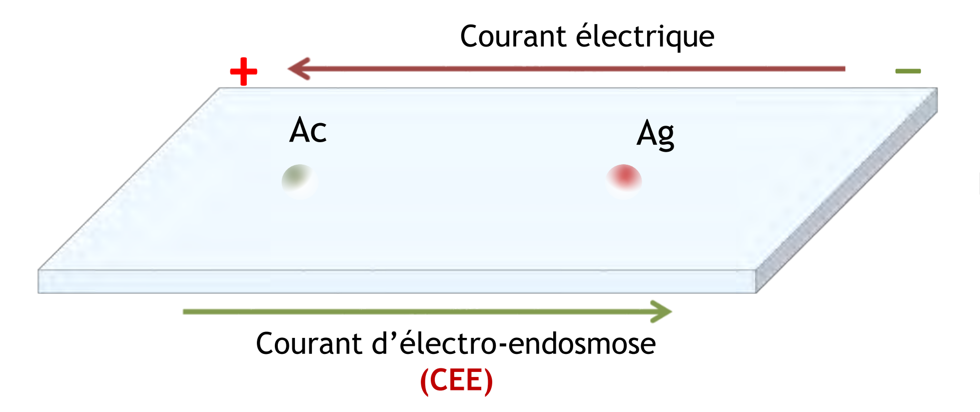
Ag1 et Ag2 ne présentent aucune identité immunochimique

(3) Identité partielle

Ag1 et Ag2 présentent une identité immunochimique Partielle

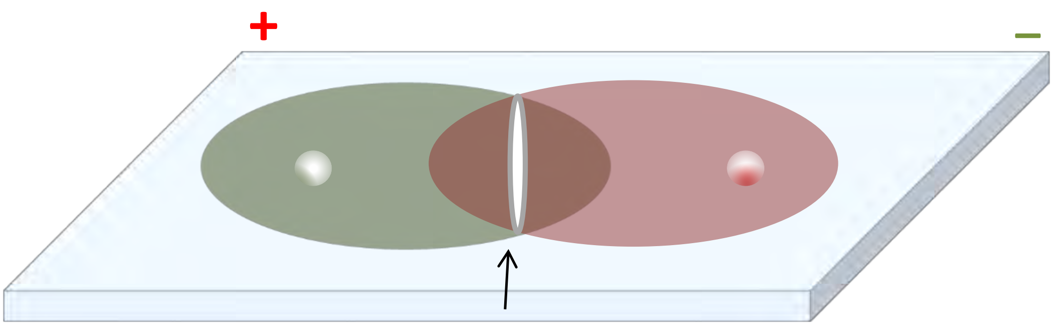
II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

c) Technique d'iélectrosynérèse



Gel avec tampon à pH neutre ou légèrement alcalin (8-9)
Avec CEE ++++

- Migration de l'Ag vers l'anode
- Migration de l'Ac vers la cathode



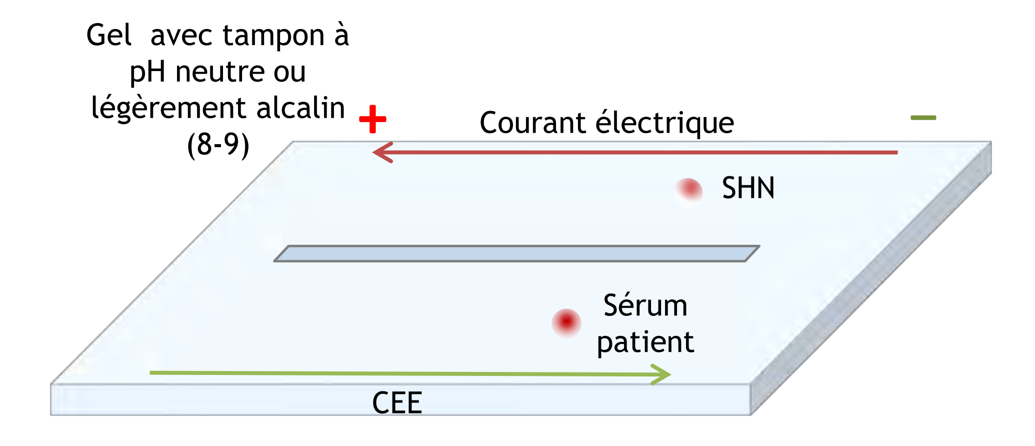
Ligne ou arc de précipitation dans la zone d'équivalence

Exemple d'application :
recherche des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles

II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

d) Analyse immunoélectrophorétique

1er Temps :



Electrophorèse :
Migration des protéines selon leur charge et taille

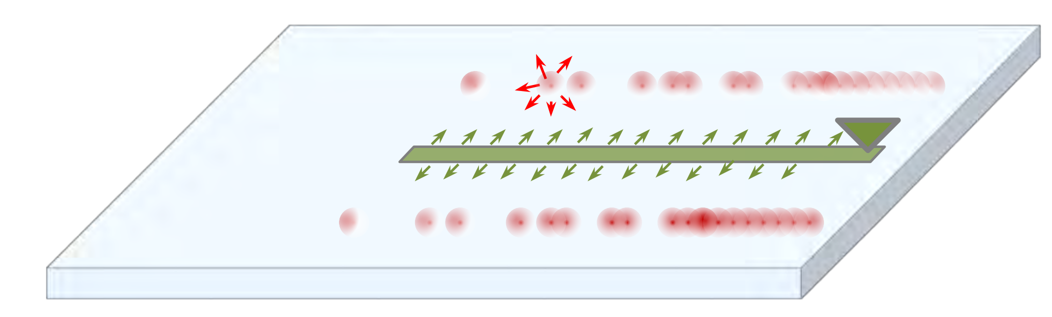


II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

d) Analyse immunoélectrophorétique

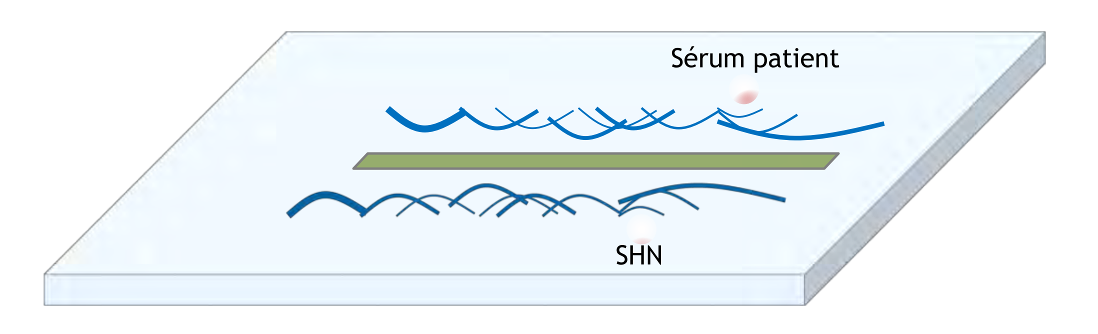


2ème Temps :



Ajout d'un immunsérum mono ou poly-spécifique

Diffusion et formation de la ligne de précipitation



II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

d) Analyse immunoélectrophorétique



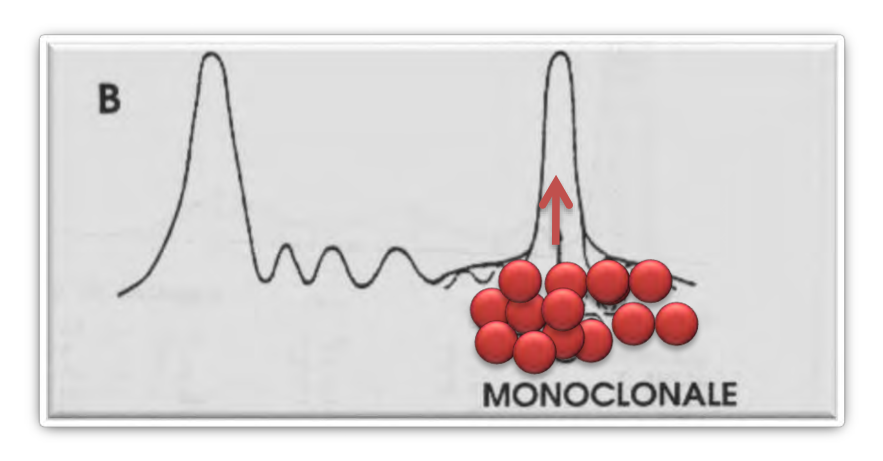
Les différentes protéines décelées par AIE :

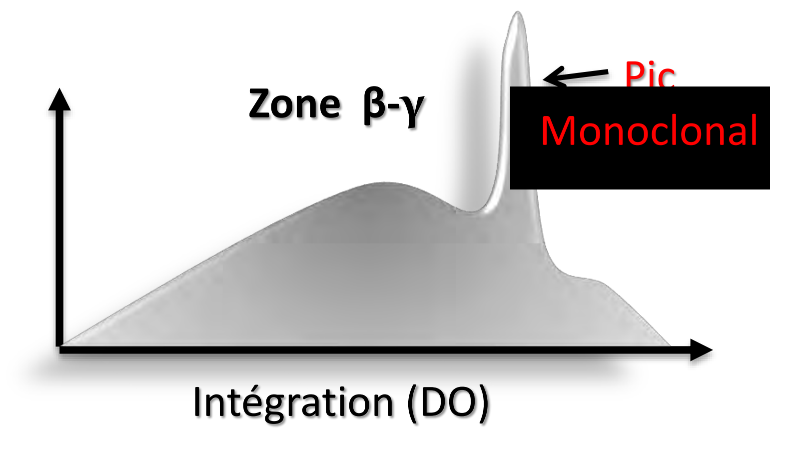
préalbumine
albumine
orosomucoïde
α_1 antitrypsine
α_1 antichymotrypsine
GC globuline
haptoglobine
céruléoplasmine
α 2 macroglobuline
hémopexine
transferrine
β lipoprotéine
β C/A complément
IgA
IgM
β2 glycoprotéine I
IgG

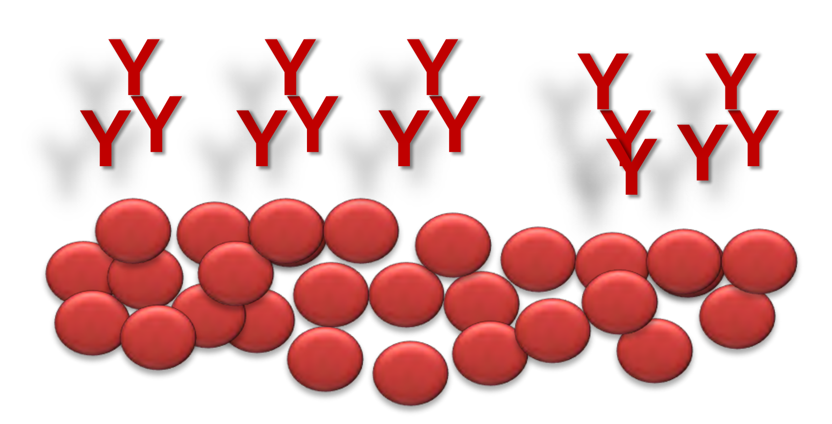
II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

d) Analyse immunoélectrophorétique

Identification d'un composant monoclonal :







Zone β- γ



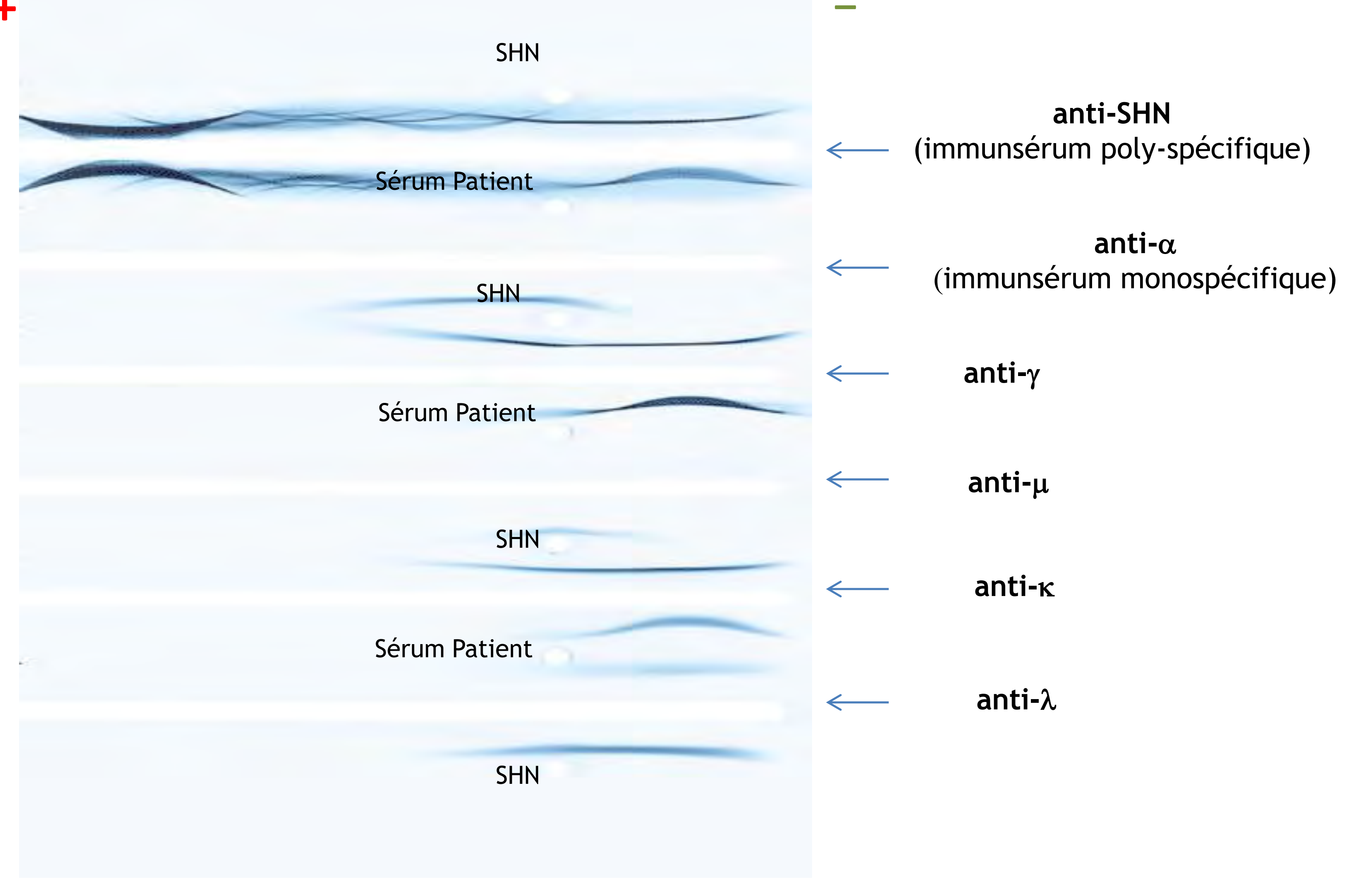
Migration électrophorétique en bande étroite

PROLIFERATION LYMPHOPLASMOCYTAIRE

HOMOGENEITE STRUCTURALE
HOMOGENEITE PHYSICOCHIMIQUE
MIGRATION EN BANDE ETROITE

II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

d) Analyse immunoélectrophorétique

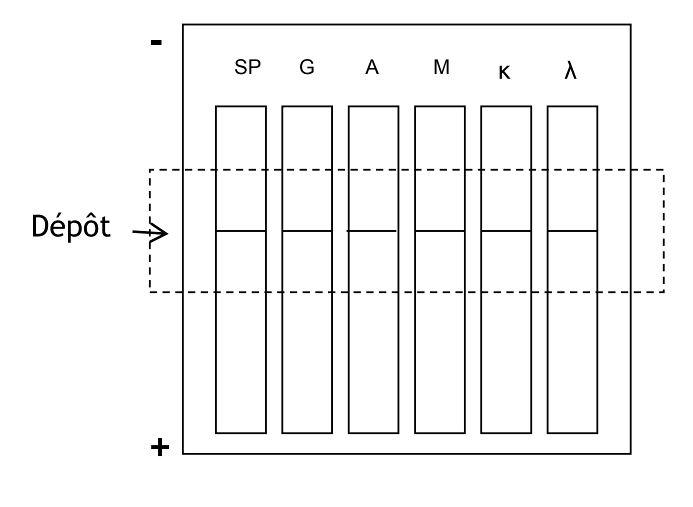


Identification d'un composant monoclonal

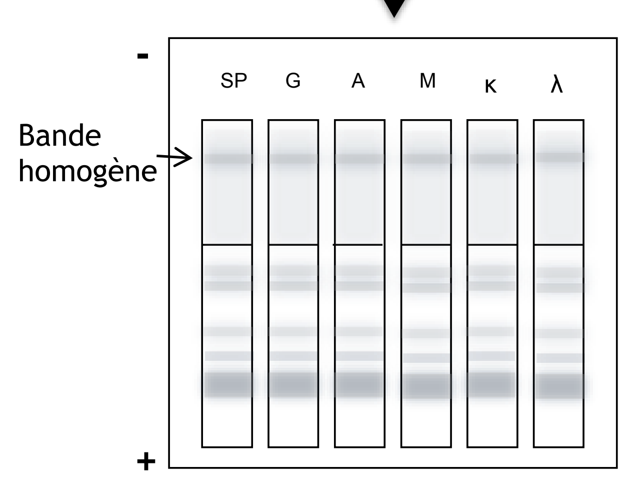
II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

e) Technique d'immunofixation

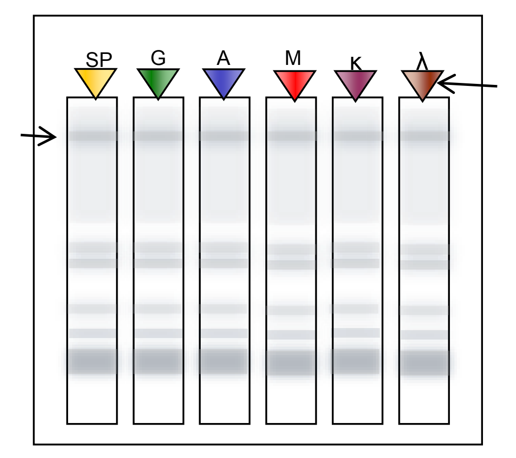
1er Temps

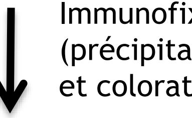


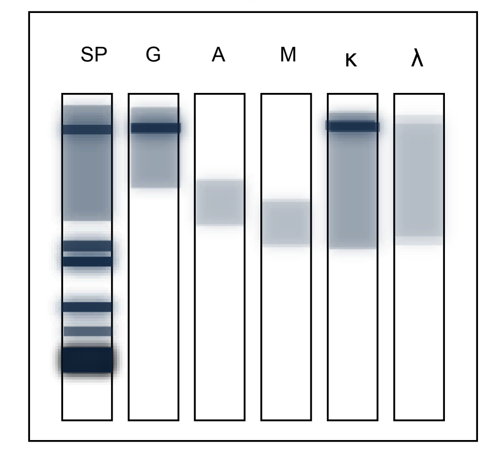




2ème Temps



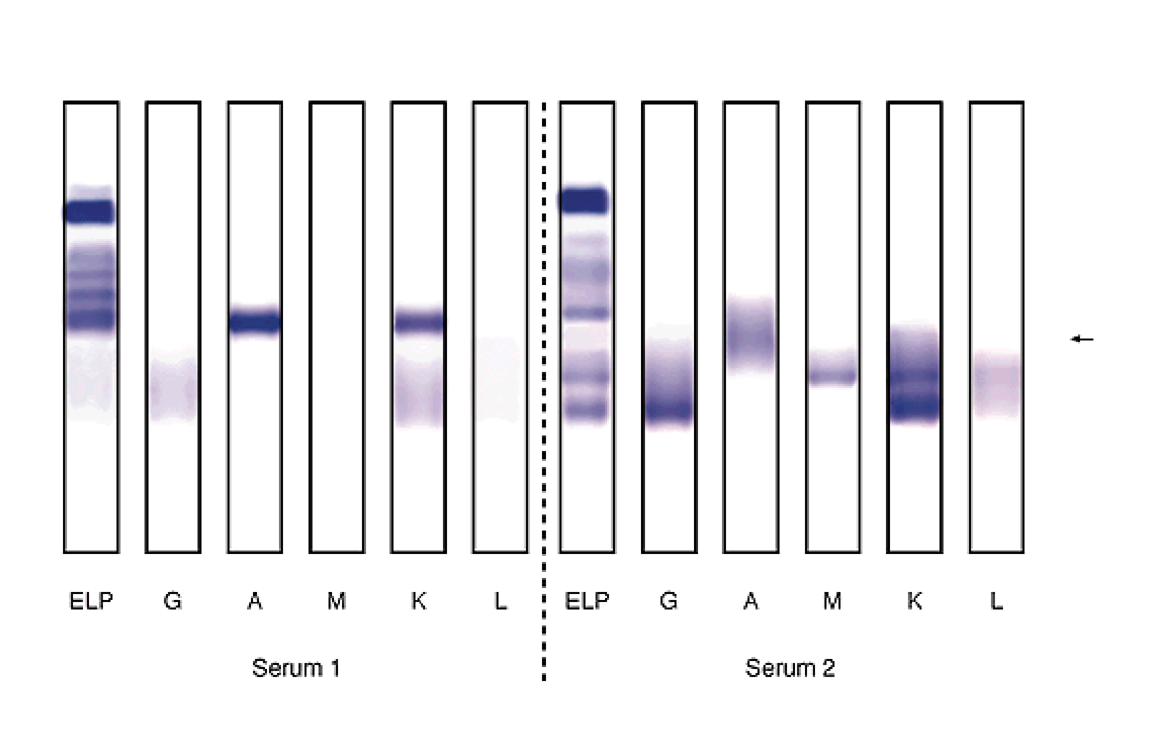




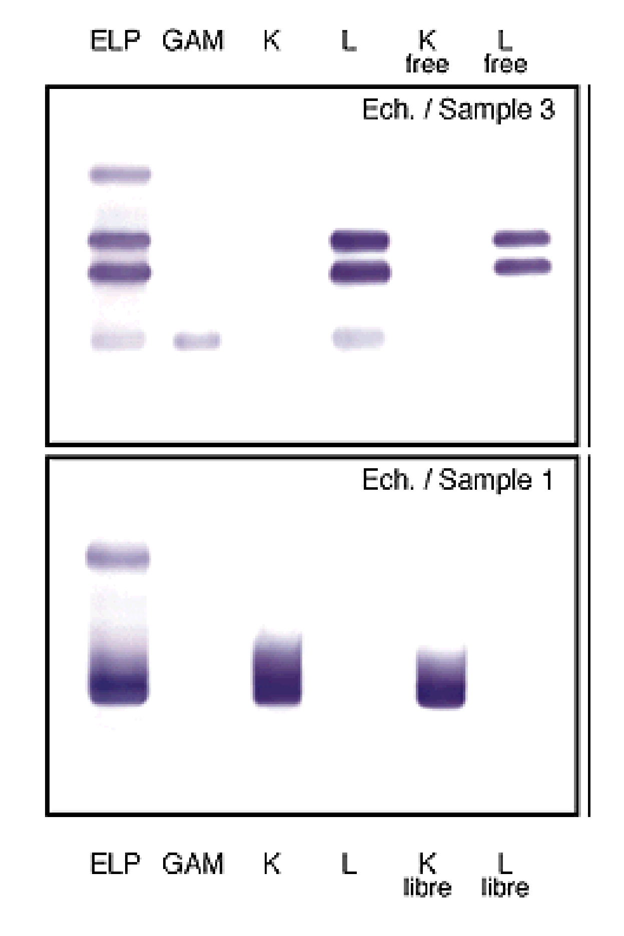
II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUALITATIVES

e) Technique d'immunofixation

Identification d'un composant monoclonal :



Immunofixation sérique



Immunofixation urinaire

II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUANTITATIVES



Les Techniques d'immunoprécipitation quantitatives :

Elles permettent le dosage d'une protéine au sein d'un mélange poly-protéique à l'aide d'un sérum mono-spécifique.



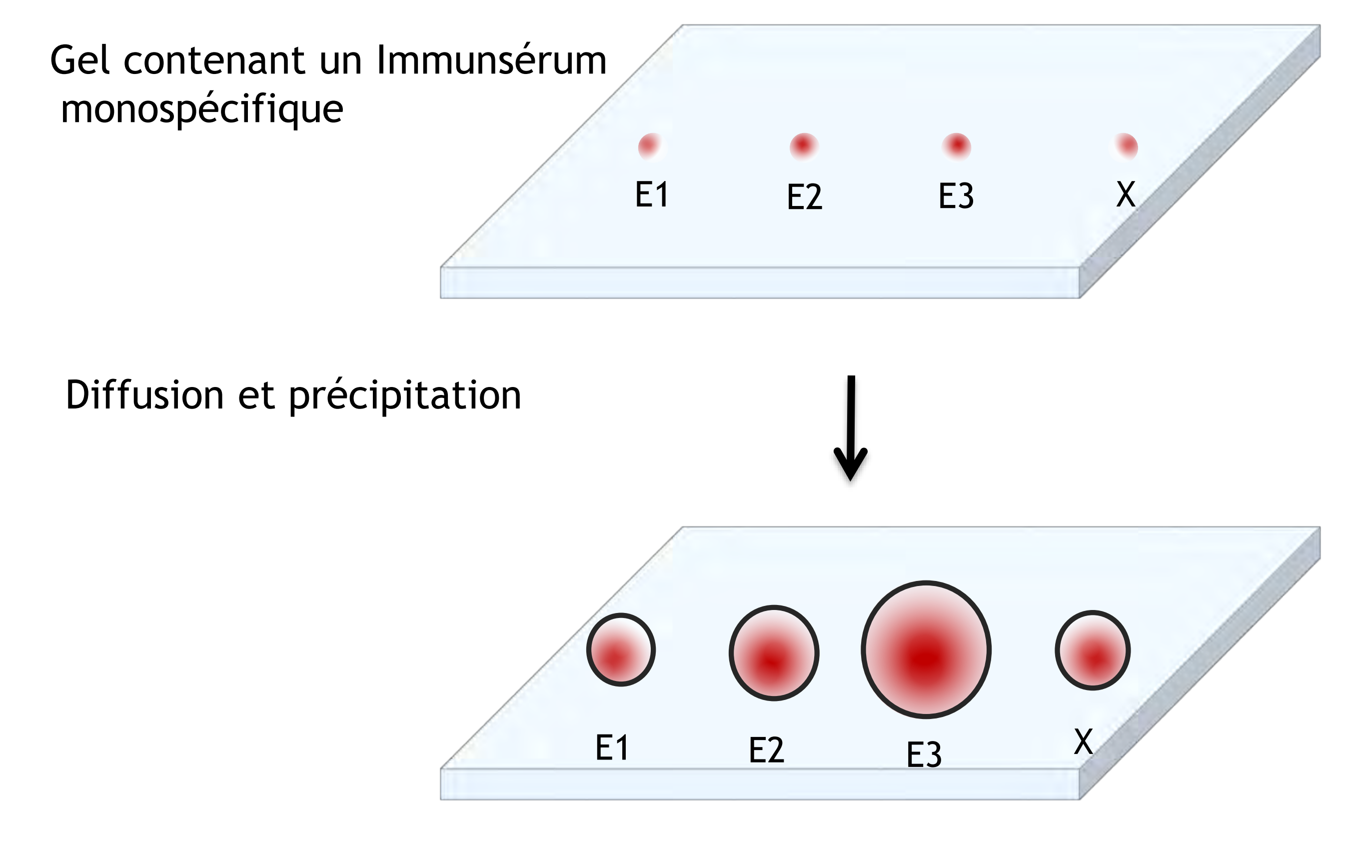
Les différentes techniques utilisées :

- Immunodiffusion radiale simple de Mancini (en milieu gélifié)
- Electroimmunoquantification (Laurell) (en milieu gélifié)
- Néphélométrie et turbidimétrie laser (en milieu liquide)

II. - TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUANTITATIVES

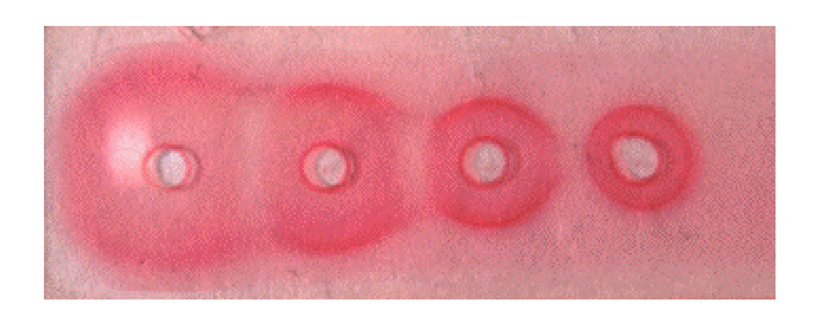
a) Technique d'immunodiffusion radiale simple (Test de Mancini)

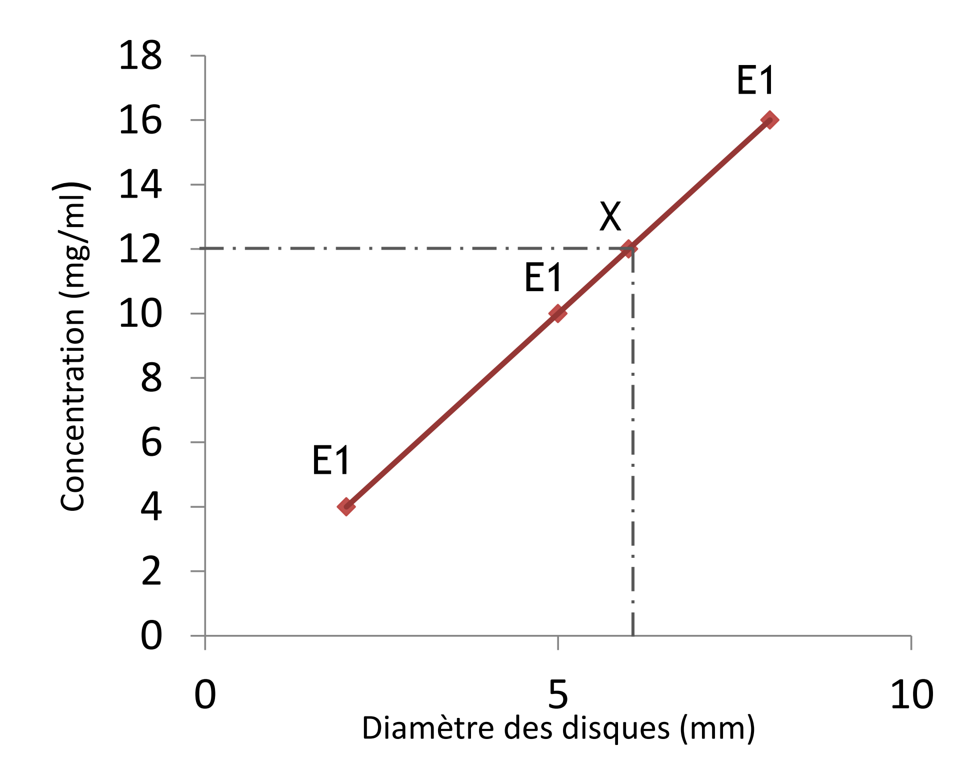
l'Immunodiffusion radiale simple, mse au point par MANCINI en 1965, est une technique d'immuno-précipitation quantitative en milieu gélifié dans laquelle un immunsérum monospécifique est incorporé à la gélose et où l'antigène, déposé sous un volume défini, diffuse à partir des puits ou godets creusés dans le gel.



[redacted] TECHNIQUES D'IMMUNOPRÉCIPITATION QUANTITATIVES

a) Technique d'immunodiffusion radiale simple (Test de Mancini)

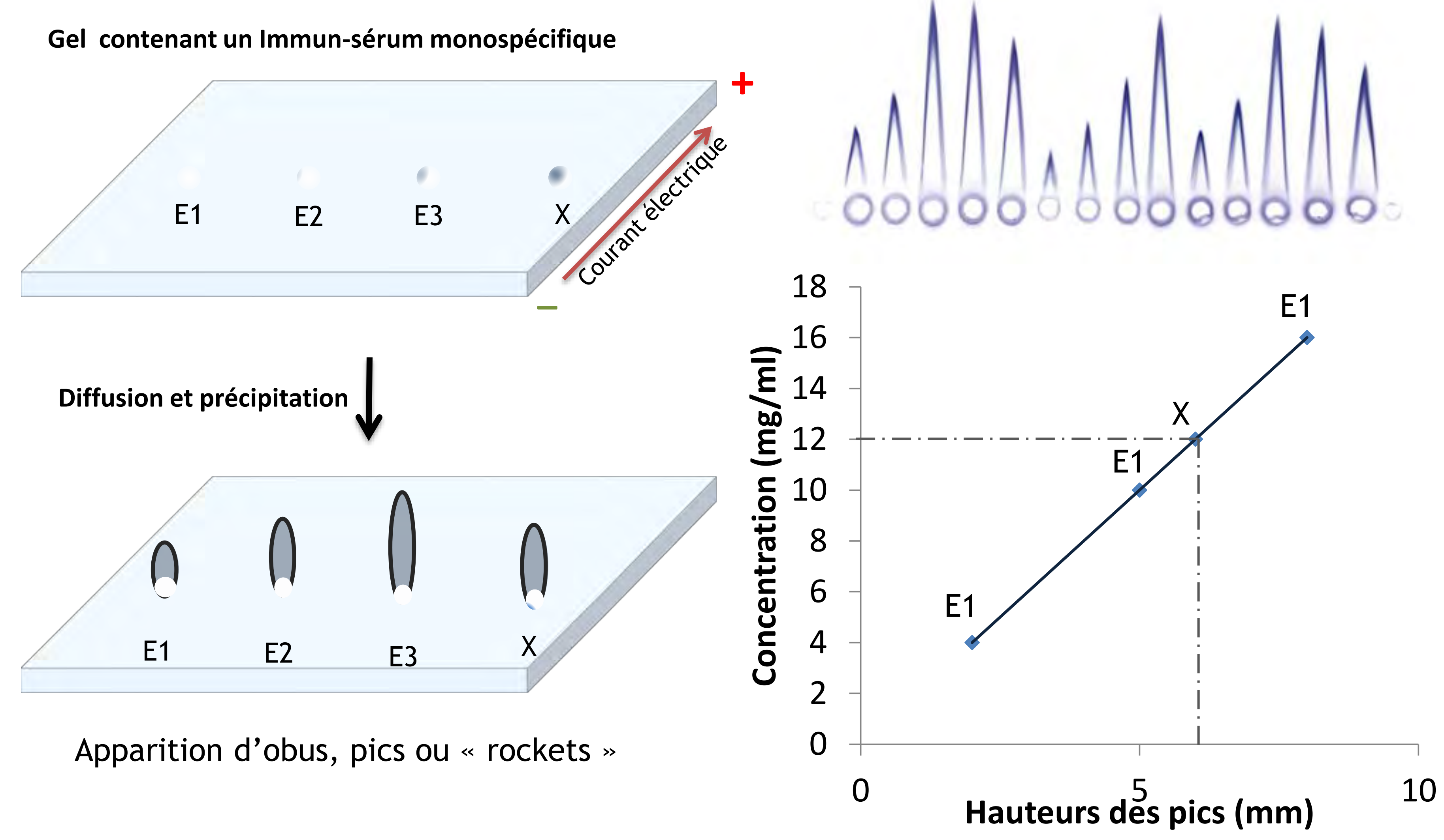




[redacted]

b) Technique d'immunoelectroquantification (Technique de Laurell)

L'électroimmunoquantification , décrite initialement par LAURELL en 1966, est une électrophorèse uni-dimentionnelle en gel d'agarose contenant un immunsérum mono-spécifique, et réalisant un gradient de concentration décroissant en antigène.



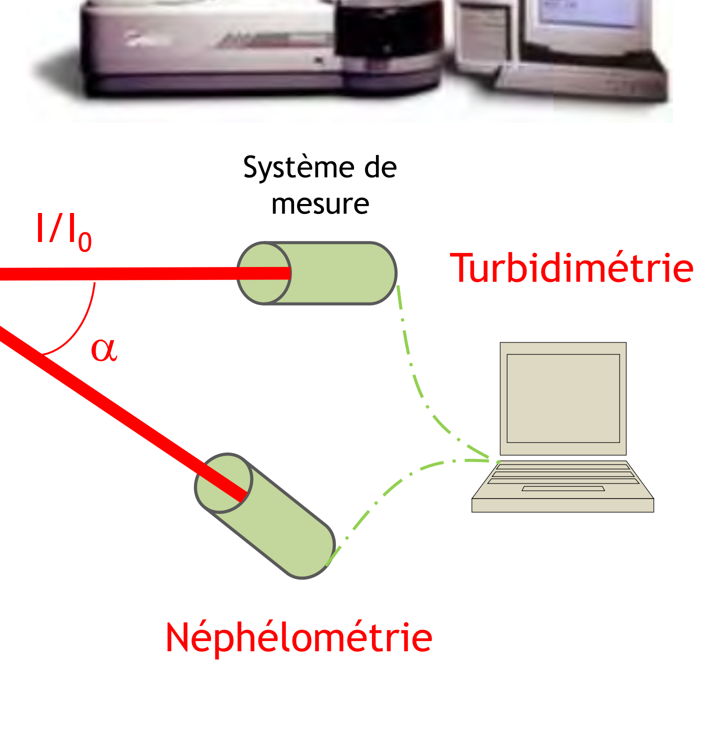
[redacted]

c) Néphélométrie et Turbidimétrie

- **L'immunonéphélémétrie à rayon laser** est basée sur la mesure de la dispersion d'un rayon LASER par des complexes immuns solubles formés en milieu liquide.

- **La turbidimétrie** est basée sur la mesure de l'absorption de la lumière par des complexes immuns formés en milieu liquide.

- **Applications : Etablissement de profils protéiques sérique, rachidien et urinaire**



[redacted]

c) Néphélométrie et Turbidimétrie

c.1- Profil protéique sérique (PPS)

- Le profil protéique sérique (PPS) est la représentation graphique du dosage de plusieurs protéines sériques dont les résultats sont exprimés en pourcentages de valeurs normalisées en fonction de l'âge et du sexe du patient, et où le 100% constitue la valeur médiane de référence.

- Le PPS classique comporte au moins les 08 protéines suivantes permettant d'explorer plusieurs axes physiopathologiques :

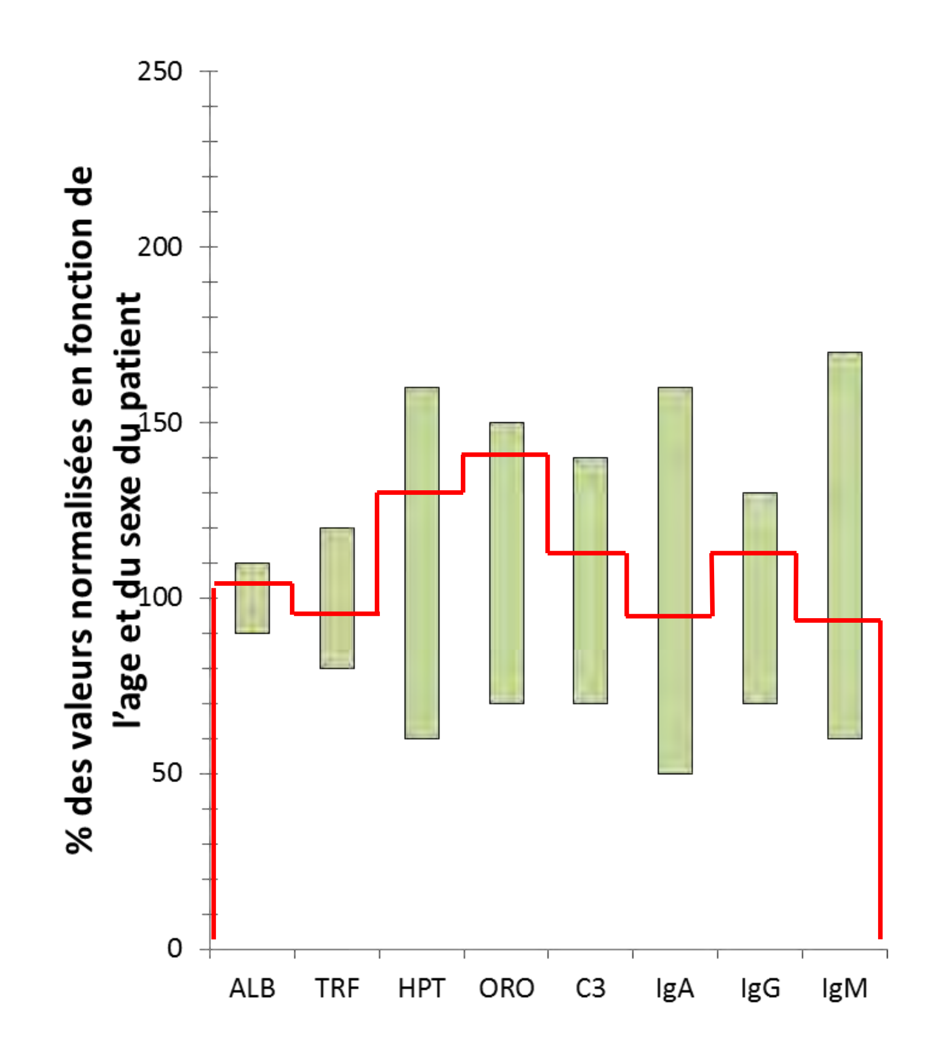
  - **Les immunoglobulines G, A, M :** impliquées dans l'immunité humorale,
  - **l'orosomucoide, l'haptoglobine, la transferrine et l'albumine:** toutes d'origine hépatocytaire et impliquées essentiellement dans l'insuffisance hépatique et l'inflammation .
  - **la fraction C3 du complément :** également d'origine hépatocytaire et impliquée aussi bien dans les processus immuns que dans les processus inflammatoires.

[redacted]

c) Néphélométrie et Turbidimétrie

c.1- Profils protéiques sériques (PPS)

Protéines	Valeurs normales moyennes (adulte)
Albumine (Alb)	35 à 55 g/l
Orosomucoide	0,55 à 1,4 g/l
CRP	<10 mg/l
Haptoglobine (Hpt)	1 à 3 g/l
C3	0,55 à 1,2 g/l
C4	0,20 à 0,50 g/l
C3d	75 à 85 mUI/l
C1 inhibiteur C1-INH	0,15 à 0,30 g/l
Transferrine (TRF)	2,30 à 4,30 g/l
IgG	10 à 16 g/l
IgA	0,90 à 4 g/l
IgM	0,60 à 2,5 g/l



[redacted] TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUANTITATIVES

c) Néphélométrie et Turbidimétrie

c.1- Profil protéique sérique (PPS)

Les différentes situations pathologiques retrouvées :

	ORO	Hpt	TRF	C3	ALB	Ig(G,A,M)
Réaction inflammatoire aigue modérée	+	+				
Réaction inflammatoire aigue intense	++	++	↓		↓	
Réaction inflammatoire chronique						+
Réaction inflammatoire chronique évolutive	+	+				+
Insuffisance hépato-cellulaire	↓	↓	↓	↓	↓	+++
Cirrhose	↓	↓	↓	↓	↓	+++
Syndrome néphrotique					↓↓	↓ IgG
Hémolyse sans inflammation		↓↓				
Hémolyse avec inflammation	+	N				
Hypo ou agammaglobulinémie						↓↓↓

c) Néphélométrie et Turbidimétrie

c.2- Profils protéiques urinaires (PPU)

➡ La détermination du profil protéique urinaire (PPU) repose sur le dosage de 4 protéines urinaires considérées comme marqueurs de l'atteinte glomérulaire ou tubulaire du nephron :

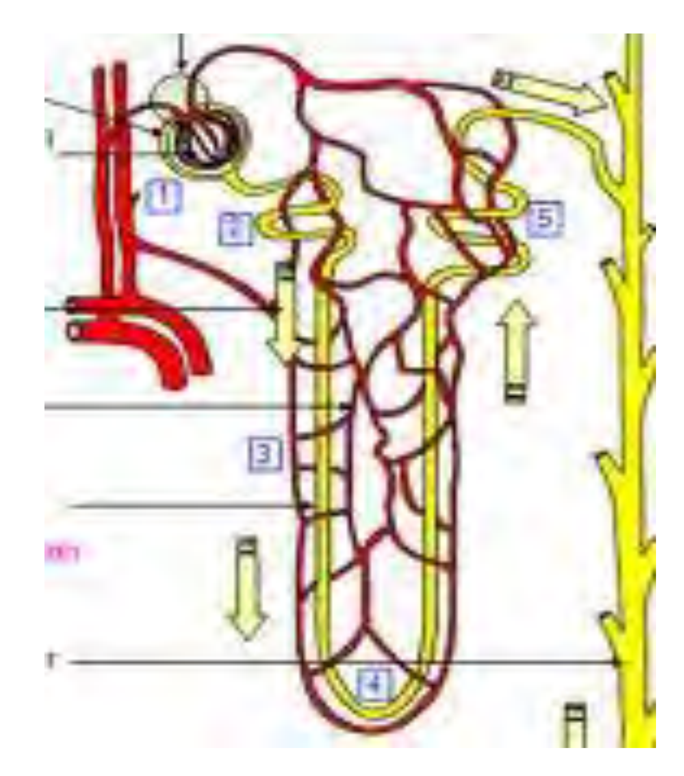
- **L'albumine et les IgG**, comme témoins d'une atteinte glomérulaire,
- **L'alpha 1 microglobuline (α1M) et le Rétinol Binding Protein (RBP),** comme témoins d'une atteinte tubulaire.

➡ Le PPU ne doit être effectué que si la protéinurie (PU) est ≥ à 150 mg par 24 heures :

PU (mg/l) X diurèse (l) = PU (mg/24 heures)

➡ Doit être considérée comme pathologique, une PU :

- ≥ à 140 mg/24 heures chez le jeune enfant,
- ≥ à 150 mg/24 heures chez l'adulte



c) Néphélométrie et Turbidimétrie

c.2- Profils protéiques urinaires (PPU)

Les différents types de profils protéiques urinaires fréquemment rencontrés :

Protéine	Valeurs normales (mg/24 heures)	PPU micro-albuminurie	PPU glomérulaire	PPU Tubulaire	PPU mixte
Albumine	< 30	30 à 300	> 300	< 30	> 300
IgG	< 10	< 10	N ou ↗	< 10	N ou ↗
α1M	< 15	< 15	< 15	> 15	> 15
RBP	< 0,3	< 0,3	< 1	> 1	> 1

[redacted] TECHNIQUES D'IMMUNOPRECIPITATION QUANTITATIVES

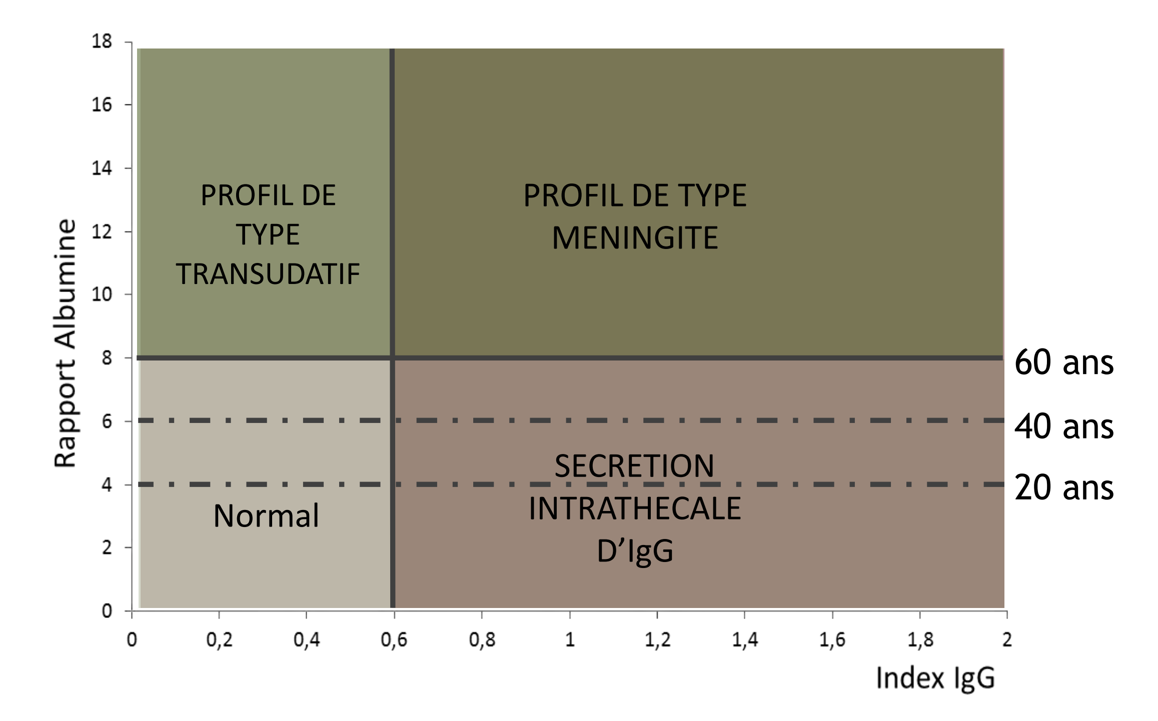
c) Néphélométrie et Turbidimétrie

c.3- Profils protéiques rachidiens

La détermination du profil protéique rachidien repose sur la détermination du **rapport albumine** et **de l'index IgG basé sur le dosage de l'albumine et des IgG dans le sérum et le LCR :**

- **Rapport Albumine =** $\frac{\text{IgG LCR (mg/l)}}{\text{Albumine Sérum (g/l)}}$

- **Index IgG =** $\frac{\text{IgG LCR (mg/l)}}{\text{IgG Sérum (g/l)}} \times \frac{\text{Albumine sérique (g/l)}}{\text{Albumine LCR (mg/l)}}$



III- LES REACTIONS D'AGGLUTINATION

III. - GENERALITES

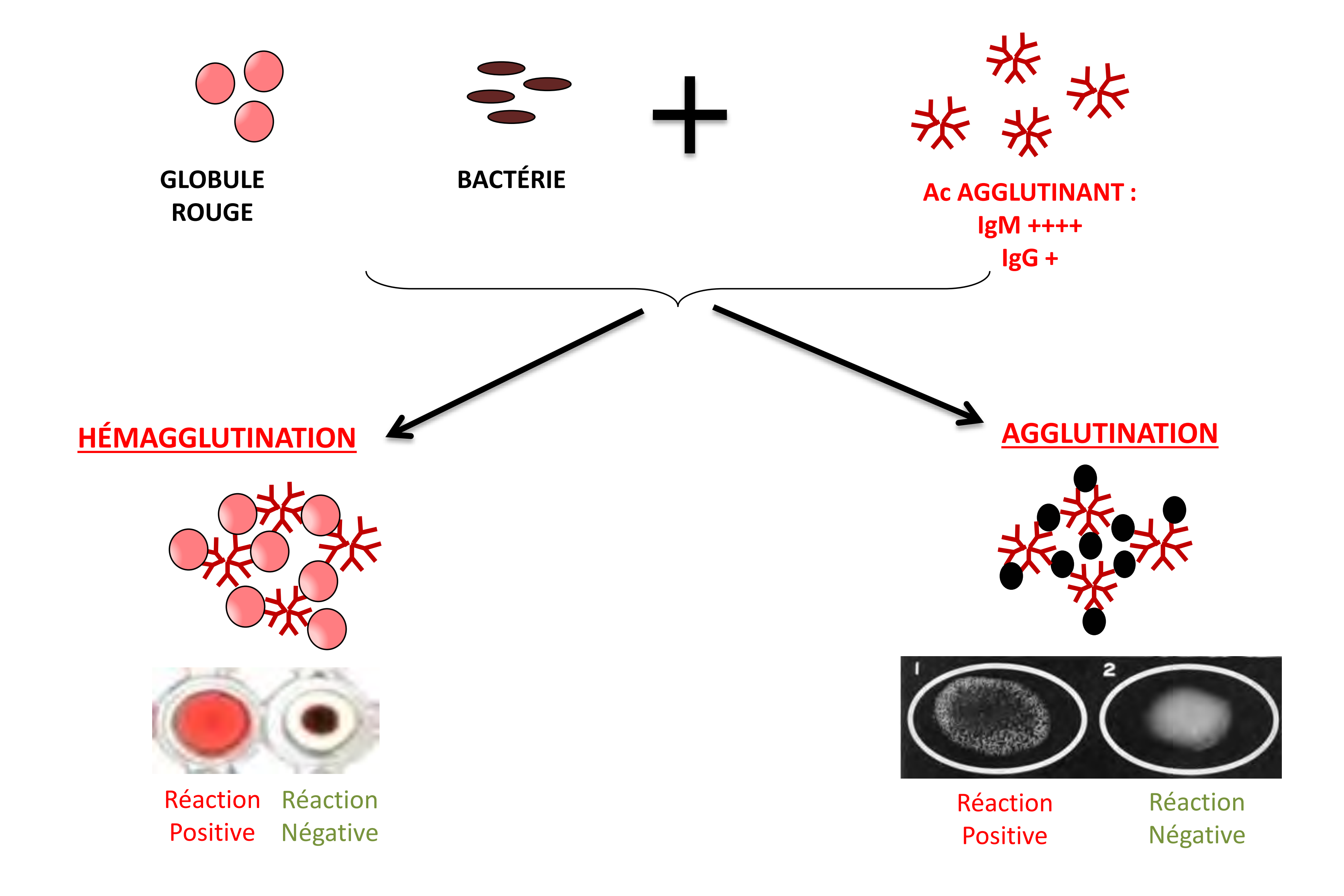
- Alors que la précipitation fait intervenir **des antigènes solubles,** Agglutination et hémagglutination mettent en jeu **des antigènes particulaires :** bactéries, globules rouges, particules insolubles recouvertes d'antigènes solubles.

- **Deux types de techniques :**

  - **Agglutination et hémagglutination directes** → les particules en suspension sont des bactéries ou des globules rouges.

  - **Agglutination et hémagglutination passives** → les particules en suspension sont des particules inertes ou des globules rouges.

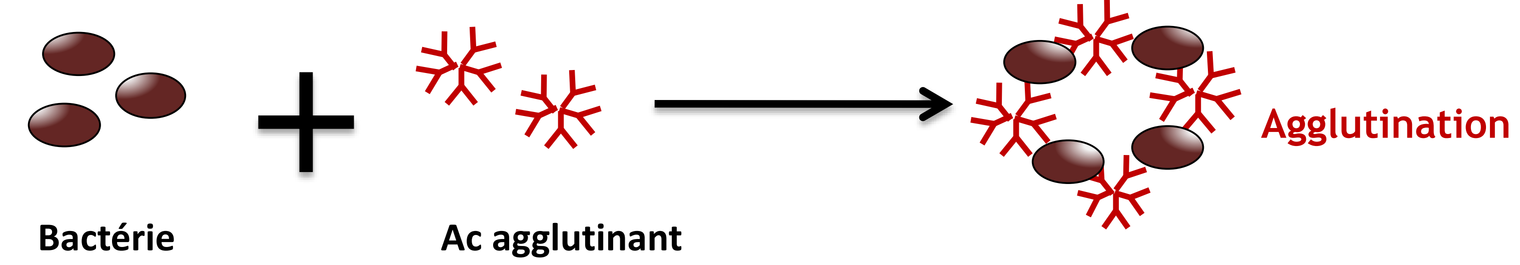
III. - AGGLUTINATION ET HEMAGGLUTINATION DIRECTES



III. - AGGLUTINATION ET HEMAGGLUTINATION DIRECTES

a) Agglutination directe

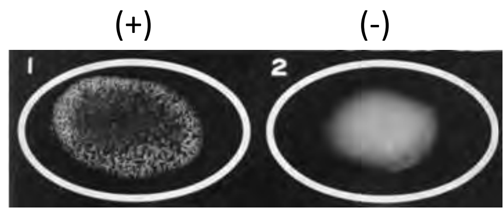
Principe :



Modalités techniques :

- **Technique qualitative sur lame** → identification antigénique des bactéries en utilisant des immunsérums agglutinants mono ou polyspécifiques et une suspension bactérienne en eau physiologique.

(+) (-)



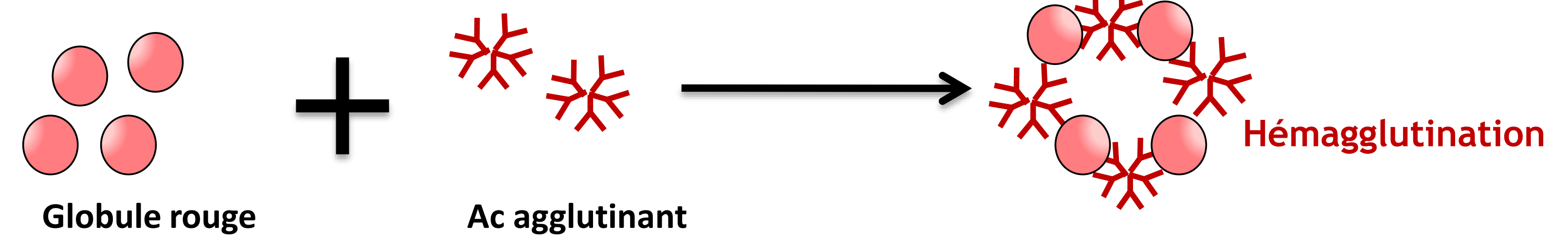
- **Technique quantitative** → diagnostic immunologique de certaines affections bactériennes.
  → Consiste à mettre des dilutions croissantes de sérum (progression géométrique de raison ½ avec une quantité fixe de suspension antigénique : **SERODIAGNOSTICS.**
  → Les sérodiagnostics les plus utilisés :
    - Sérodiagnostic de Widal dans les salmonelloses
    - Sérodiagnostic de Weil et Felix dans les brucelloses
    - Sérodiagnostic de Martin et Petit dans les leptospiroses.

Le titre su sérum étudié est donné par la plus forte dilution donnant encore une réaction positive.

III. - AGGLUTINATION ET HEMAGGLUTINATION DIRECTES

b) Hémagglutination directe

Principe :



Modalités techniques :

- **Technique qualitative** → Groupage sanguin ABO



(+) (-)

Phénotype	Ag présents sur les hématies	Ac naturels présents dans le sérum
Groupe A	Ag A	Anti-B
Groupe B	Ag B	Anti-A
Groupe AB	Antigènes A et B	Absence d'Ac anti-A et anti-B
Groupe O	Aucun Ag	Présence d'Ac anti-A et anti-B

Les phénotypes sont définis à la fois par l'Ag globulaire et l'Ac sérique par :

- ***La technique de Beth-Vincent*** pour les Ag erythrocytaires en utilisant des sérums tests anti-A, anti-B et anti-AB.
- ***La technique de Simonin*** pour les hémaggutinines du sérum en utilisant des globules rouges tests A, B et AB.

- **Technique quantitative** → Titrage des hémagglutinines anti-A et anti-B selon les mêmes modalités que les sérodiagnostics.

III. - AGGLUTINATION ET HEMAGGLUTINATION DIRECTES

b) Problèmes particuliers rencontrés



Auto-agglutination → phénomène non spécifique rencontré principalement avec les bactéries ***« Rough »*** qui se caractérisent par un nombre de groupements hydrophiles trop faible à leur surface et s'accolent les unes aux autres, contrairement aux bactéries ***« Smooth »*** qui restent en suspension dans l'eau physiologique en raison de leur grand nombre de groupements hydrophiles à leur surface.



Phénomène de zone :

- Observé dans le sérodiagnostic de Wright utilisé pour le diagnostic sérologique de la brucellose.
- Se manifeste par l'absence de d'agglutination aux faibles et aux fortes dilutions.
- Est dû à la présence de deux populations d'anticorps :
    - Ac non agglutinants de type IgG,
    - Ac fortement agglutinants de type IgM.

Lors des faibles dilutions, Les Ac non agglutinants satureraient les sites empêchant l'action des Ac agglutinants.

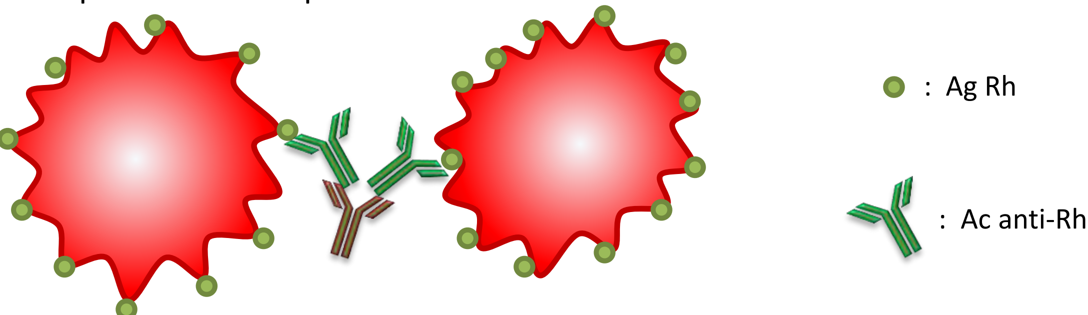
III. - AGGLUTINATION ET HEMAGGLUTINATION DIRECTES

b) Problèmes particuliers rencontrés



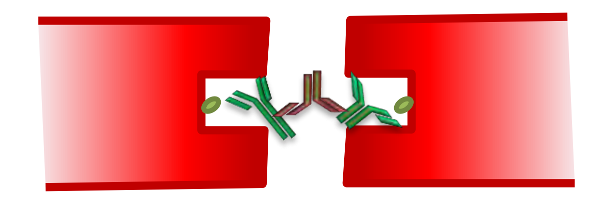
Anticorps anti-Rhésus :

- Le Système Rhésus comprend les Antigènes D, C, c, E, e., mais c'est la détermination de l'Ag D qui est le plus couramment effectué.
- Les Ac anti-Rh sont dits ***Ac bloquants*** car ils sont capables de s'unir à ce facteur mais sont incapables d'agglutiner les GR correspondants.
- Parmi les moyens mis en œuvre en vue d'éliminer l'action des Ac bloquants on peut utiliser :
  - Le traitement par une enzyme protéolytique comme la papaïne qui va dégager les sites antigéniques, ce qui permet aux anticorps d'établir des ponts entre les GR.

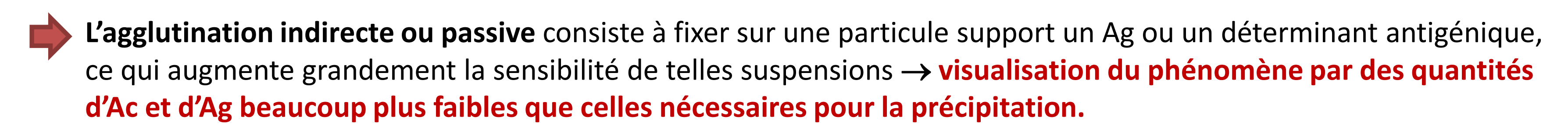


  - L'utilisation d'anti-globulines humaines, anticorps dont la spécificité est dirigée contre les Ac bloquants.





III. - AGGLUTINATION ET HEMAGGLUTINATION INDIRECTES



L'agglutination indirecte ou passive consiste à fixer sur une particule support un Ag ou un déterminant antigénique, ce qui augmente grandement la sensibilité de telles suspensions → **visualisation du phénomène par des quantités d'Ac et d'Ag beaucoup plus faibles que celles nécessaires pour la précipitation.**

On utilise comme support :

- ***Des particules inertes :*** Cholestérol et charbon (utilisés dans les réactions de Kline et VDRL pour le diagnostic de la syphilis), Particules de latex (les plus utilisées actuellement) .
- ***Des Globules rouges :*** GR humains O, GR de mouton . Dans ce cas on parle **d'hémagglutination.**

Particules de latex

Ag

GR

Ag

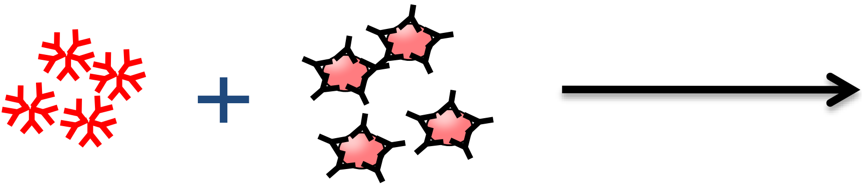
Ac agglutinant

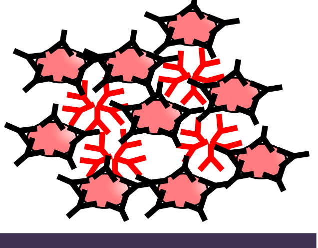
Agglutination / Hémagglutination

III. - AGGLUTINATION ET HEMAGGLUTINATION INDIRECTES

Exemple : Test de Waaler Rose

Le diagnostic immunologique de la polyarthrite rhumatoïde (PR) repose sur la mise en évidence, dans le sérum, du facteur rhumatoïde (FR), auto-anticorps dirigé contre le fragment Fc des IgG. **Le test de Waaler Rose** est une réaction d'hémagglutination passive réalisée avec des GR humains de groupe O Rh (-) sensibilisés à l'aide d'anticorps de lapin anti-GR humains et qui donnent lieu à une hémagglutination en présence de facteur rhumatoïde d'isotype IgM. Il permet donc le titrage sérologique de ce FR.

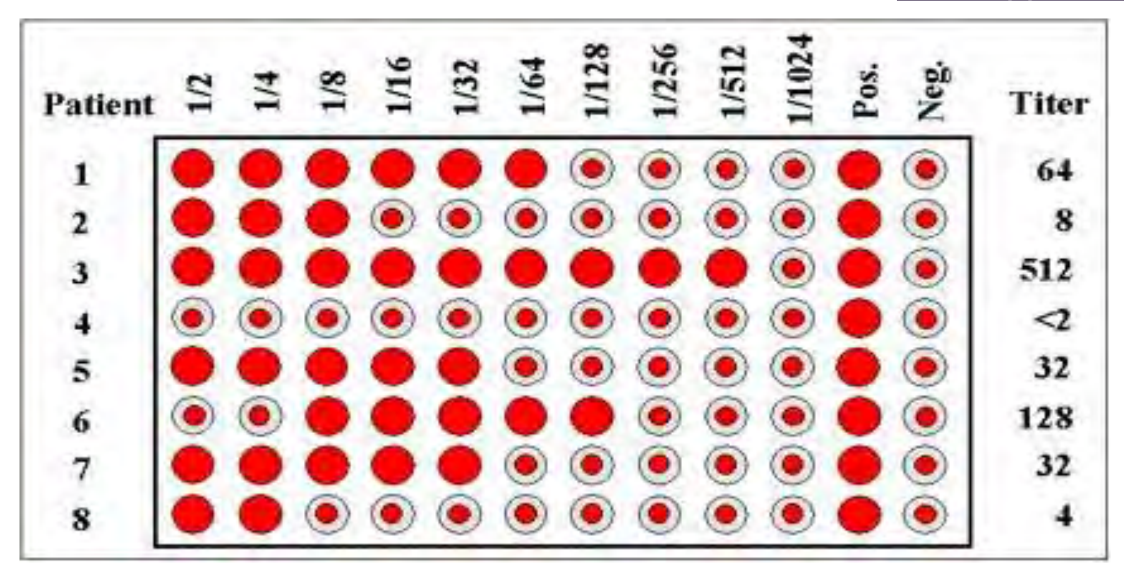






GR O Rh Neg humains sensibilisés par des Ac de lapin anti-GR humains

Hémagglutination



Titre : l'inverse de la plus grande dilution donnant encore une réaction positive

III. · INHIBITION DE L'AGGLUTINATION ET HEMAGGLUTINATION PASSIVES

Exemple d'application → le test de grossesse qui est basé sur le dosage de l'hormone gonadotrophine chorionique (βHCG).

